

## 様式 C-19

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791027

研究課題名（和文）変性椎間板の組織再生における基礎的研究

研究課題名（英文） A Phenotypic Comparison of Proteoglycan Production of Intervertebral Disc Cells Isolated from Rats, Rabbits and Bovine Tails: Which Animal Model is Most Suitable to Study Tissue Engineering and Biological Repair of Human Disc Disorders?

研究代表者

宮崎 剛 (MIYAZAKI TSUYOSHI)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80324169

研究成果の概要（和文）：本研究では、脊索性髄核細胞を有するラットおよびウサギ、軟骨性髄核細胞を有するウシの髄核細胞を使用し、これら動物種の髄核細胞の形態学的特徴、並びに細胞代謝の指標である乳酸産生量、 $^{35}\text{S}$ -sulphate を用いたプロテオグリカン（PG）合成能、及び dimethylmethylene blue assay を用いたグリコサミノグリカン（GAG）産生量の違いについて *in vitro* で検討した。その結果、三次元培養下で観察した髄核細胞の乳酸産生量、PG 合成能及び GAG 産生量は、ラットとウサギではウシに比べ明らかな高値を示し、脊索細胞の細胞代謝活性の高さを示す結果を認めた。

研究成果の概要（英文）：In humans, notochordal cells disappear from the NP and are replaced with chondrocytic cells by adolescence. However, notochordal cells of the NP persist into adult life in some species, such as rats and rabbits. Therefore, comparison of the metabolic activity of notochordal and non-notochordal cells is considered to be important for determining the type of cell to use for transplantation to regenerate intervertebral discs. In this study, we investigated the notochordal NP cells of rats and rabbits, as well as non-notochordal (chondrocyte-like) bovine NP cells, in a three-dimensional culture system to examine whether proteoglycan metabolism varied among these three cell types. In conclusion, this study demonstrated marked differences of energy metabolism and production of matrix components between notochordal and nonnotochordal NP cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：整形外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：骨・軟骨代謝学、変性椎間板、三次元軟骨培養、椎間板再生、動物モデル

### 1. 研究開始当初の背景

日本において、一生涯のうち治療を要する腰痛を男性においては60%、女性においては50%において経験するといわれ、また米国においては45歳以下の就業不能原因の一番の理由として腰痛疾患があげられている。これら腰痛疾患の重要な発症要因のひとつとして椎間板変性を挙げることが出来る。しかし椎間板変性の機序はいまだ明らかではなく、治療においても、様々な施設でヒト変性椎間板に対する基礎研究が行われているが、日本では新鮮なヒト椎間板組織を実験に用いることが難しく、研究を行うにあたっては種々の動物を用いざるをえない。

### 2. 研究の目的

椎間板の髄核組織は、その細胞種により脊索性髄核細胞(notochordal disc)と、硝子様軟骨細胞である非脊索性髄核細胞(non-notochordal disc)の二群に大別される。これまで椎間板再生の研究ではラット、ウサギ等、脊索性髄核細胞を有する動物種と、ウシなどでみられる、ヒトに近似した非脊索性髄核細胞を有する動物種を用いて行われているが、脊索性髄核細胞と非脊索性髄核細胞の相違点に関して議論されることは少ない。本研究では、脊索性髄核細胞を有する動物種としてラットおよび家兎、非脊索性髄核細胞を有する動物種としてウシ髄核細胞を使用し、これら動物種の髄核細胞の組織形態、乳酸産生量および、プロテオグリカン産生量の違いについて in vitro に検討した。

### 3. 研究の方法

15週齢のラットの腰椎椎間板、6ヵ月齢の日本白色家兎及び18-24ヵ月齢のウシ尾椎椎間板より髄核細胞を清潔下に分離後、コラゲナーゼを含んだ370mOsmのDMEM溶液を用いて18時間で細胞を分離し、細胞密度が $4 \times 10^6$  cells/mlとなるようにalginate gelを混入した。次に21G針より塩化カルシウム溶液内にalginate gelを滴下しビーズを作成、6% FCSを添加したDMEM溶液中に各well 5個ずつとなるようにわけ、21%酸素下で5日間の培養を行った。細胞の生存率はトリパンブルー染色で観察し、細胞代謝の指標として乳酸

産生量を、またグリコサミノグリカン (GAG) の産生量をDMB assayを用いて計測した。また形態学的な違いを光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡にて評価した。

### 4. 研究成果

ラット、家兎の髄核組織のHE染色では、複数の細胞によるクラスターの形成を認め、細胞内に胞体形成がみられ、細胞数もウシと比較して多く存在していた(図1A, 1B)。それに対してウシの椎間板組織では細胞はchondrocyte likeであり胞体形成は見られず細胞数も少ない(図1C)。また透過型電顕像では、ラット、家兎においては核周囲に大小様々な胞体の形成を認め、細胞間にtight junctionを認めた。ウシ髄核細胞では細胞の直径も小さく、clusterの形成も無かった。次に細胞培養では、細胞の生存率は培養3日後そして5日後で各群とも90%以上であった。乳酸産生量は、ラットで平均37.6 mM/cell/24hrs、ウサギにおいては36.2mM/cell/24 hrs、ウシで平均18.5 mM/cell/24hrsとラットとウサギにおいて細胞代謝活性が高い結果であった。ビーズ内の

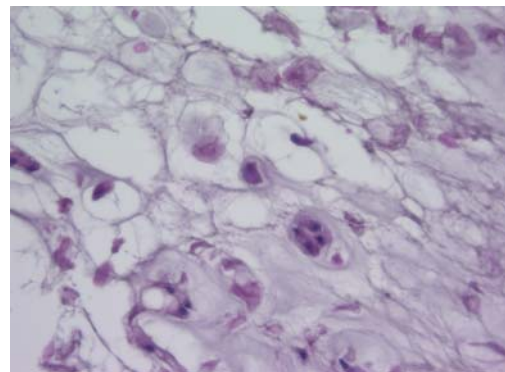


図 1A

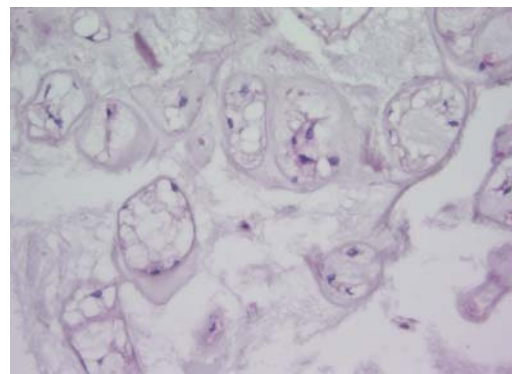


図 1B



図 1C

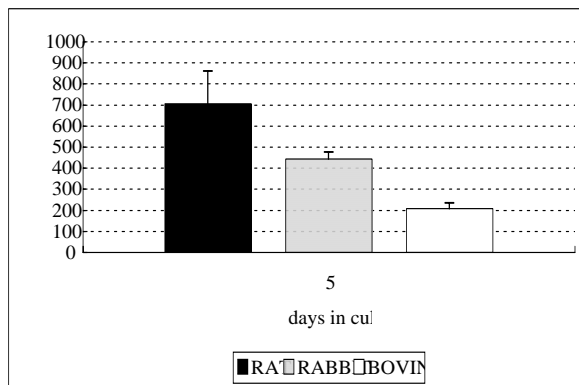


図 2

glycosaminoglycan 産生量では、培養 3 日目、5 日目ともにウシに比べ、ラットで産生量が多く、培養 5 日目において、ラットと家兔、成牛でそれぞれ平均 704.8、444.3、207.4  $\mu$ g/ml でラットはウシと比較して約 3.5 倍、ウサギにおいては約 2 倍の glycosaminoglycan 産生がみられた(図 2)。

脊索細胞はラットやマウス、ウサギ、ネコ、ブタにおいて一生椎間板組織内に存在しており、ヒトにおいても 4 歳頃までの乳幼児の椎間板内に存在している。一方軟骨性髄核細胞はウシ、ヒツジ、ヤギ、そしてヒトにおいては 4 歳時以降の椎間板組織において見られる(1)。このように動物種によって椎間板内に存在する細胞形態は異なり、ヒトにおいては成長に伴い椎間板細胞が軟骨性髄核細胞に変化することがこれまでに明らかにされている(2)。また椎間板細胞数は加齢によって減少することが知られており、この細胞の変化や数の減少がもともと椎間板内にある細胞がアポトーシスすることで生じるのか、脊索細胞が非脊索細胞に分化するためなのか、椎体終板および線維輪から

の栄養が減少するためなのか不明である(1)、(3)、(4)。Hunter らは脊索細胞の減少が椎間板変性の初期変化である可能性を指摘しており、乳幼児期における椎間板の形成と維持に脊索細胞がきわめて重要な役割を果たしていることを報告している(5)。今回我々はラット、ウサギ、成牛を用いて、脊索性髄核細胞と非脊索性髄核細胞の両者の細胞機能について 3 次元培養を用いて比較を行ったが、これまでに、Capello らはグレイハウンドとビーグル犬を用いて脊索性髄核細胞と非脊索性髄核細胞の二種類の細胞における proteoglycan 合成能を、35S を用いて測定しており、脊索性髄核細胞において約 1.6 倍、proteoglycan 合成能が高かったと報告している(6)。我々が 35S を用いて行った実験結果でも proteoglycan 合成能は培養 5 日目において、脊索細胞であるラットにおいて約 2 倍、ラビットにおいて約 1.8 倍、ウシ椎間板細胞よりも高値であった。また細胞代謝の指標である乳酸産生量においてもラット、ウサギにおいて約 2 倍の産生量を生じており 35S を用いた実験結果とほぼ同様の結果となった。またこれまで脊索性髄核細胞と非脊索性髄核細胞の両者において GAG の産生量を定量的に測定した報告はないが、今回の我々の測定結果では単位細胞数あたり、ウシと比較して、ラットにおいて約 3.5 倍、ウサギにおいて約 2 倍の GAG 産生がみられた。また Capello らは、グレイハウンドでは成長に伴う脊索性髄核細胞の減少がみられず、成犬の髄核組織は非常にゲル状であり椎間板変性もみられないと報告している。一方ビーグル犬では早期より脊索性髄核細胞が減少し、椎間板では proteoglycan の産生の減少、コラーゲンの増加、含水量の低下を生じ椎間板の線維化が早期よりみられることを報告している(6)。今回の我々の結果から、ラットやウサギなど脊索性髄核細胞により髄核が形成されている動物種と、ヒトに代表される、軟骨性の非脊索性髄核細胞で髄核が形成されている動物種間では、両者の椎間板軟骨細胞の細胞代謝活性や形態が明らかに異なっていることがわかった。近年、生体内での椎間板修復や椎間板軟骨細胞の培養およびその際に必要とされる生物学的手法が注目されている。しかし、この結果からも臨床応用をめざした tissue engineering の研究ではヒトの椎間板に類似した軟骨性髄核細胞の動物種で研究することが望ましいと考えられた。

【結語】脊索性髄核細胞と軟骨性髄核細胞との比較では、細胞の代謝活性は明らかに前

者で高かった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

①

Miyazaki T, Kobayashi S, Takeno K, Meir A, Urban J, Baba H. A Phenotypic Comparison of Proteoglycan Production of Intervertebral Disc Cells Isolated from Rats, Rabbits and Bovine Tails: Which Animal Model is Most Suitable to Study Tissue Engineering and Biological Repair of Human Disc Disorders? Tissue Eng Part A. 2009 Dec;15(12):3835-46.

〔学会発表〕(計2件)

① 宮崎 剛 他4名 1番目

動物種間における椎間板軟骨細胞の形態学的差異および細胞代謝活性の比較 -ラット、ラビット、ウシ、ヒト間の比較-  
第24回日本整形外科学会基礎学術集会  
2009.11.5 横浜

② 宮崎 剛 他4名 1番目

形態学的差異から見た椎間板軟骨細胞の細胞代謝の違いについて  
第23回日本整形外科学会基礎学術集会  
2008.10.23 京都

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

宮崎 剛 (MIYAZAKI TSUYOSHI)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80324169